สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานผลงานวิจัยประจำปีงบประมาณ พ ศ. 2550

เรื่อง

การผลิตL(+) กรดแลกติกโดยใช้ผลิตผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมนม (Whey) สำหรับการหมักแบบกะด้วยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863

(Production of L(+) Lacticacid Using Dairy by-product (Whey) for Batch Fermentation with *Lactobacillus casei* ATCC 10863)

โดย

รศ. สุขใจ ชูจันทร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

RCH
QD
905
.A2
ส743ก

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....83671
วัน,เดือน,ปี.....11 ก.ย. 2551

.b.....11981819
.i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรอาหารทั้ง 9 สูตรประกอบด้วย

สูตรอาหาร	เวย์	สารสกัดยีสต์	เปปโตน	น้ำตาลแลกโตส	แร่ธาตุ
สูตรที่ 1	-	+	+	+	+
สูตรที่ 2	+	+	-	+	+
สูตรที่ 3	+	-	+	+	+
สูตรที่ 4	+	+	+	-	+
สูตรที่ 5	+	+	+	+	-
สูตรที่ 6	+	-	-	+	+
สูตรที่ 7	+	-	-	-	+
สูตรที่ 8	+	-	-	+	-
สูตรที่ 9	+	-	-	-	-

ที่มา : ดัดแปลงจาก Roukas and Kotzekidou (1998), Fu and Mathew (1999), Fitzpatrick *et al.* (2001) , Nancib *et al.* (2005) และ Idris and Suzana (2006)

หมายเหตุ + หมายถึง เติม - หมายถึง ไม่เติม

องค์ประกอบสูตรอาหารมีดังนี้ สารสกัดยีสต์ร้อยละ 0.5,เปปโตนร้อยละ 1,น้ำตาลแลกโตสร้อยละ 50 และแร่ธาตุประกอบด้วยไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร,แมงกานีสซัลเฟต 0.03 กรัมต่อลิตร, แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.1 กรัมต่อลิตร โดยใช้เวย์ปรับปริมาตร 1 ลิตร

2. การศึกษาสภาวะต่าง ๆที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดแลกติก

2.1 การศึกษาความเร็วรอบที่เหมาะสม

เลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ1 ศึกษาความเร็วรอบที่เหมาะสมโดยผันแปรความเร็วรอบ ที่สภาวะนิ่งและที่ความเร็วรอบ 50, 70, 100, 150 และ 200 รอบต่อนาที ทำการทดลองโดยใช้สภาวะการหมัก วิเคราะห์ผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติเช่นเดียวกับข้อ 1.

2.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

เลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ1 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมโดยผันแปรอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิห้อง 35 37 40 และ 42 องศาเซลเซียสและสภาวะที่ได้จากการทดลองข้อ 2.1 ทำการทดลองโดยใช้สภาวะการหมัก วิเคราะห์ผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติเช่นเดียวกับข้อ 1.

3. ศึกษาการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC10863 โดยการหมักระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรและการหมักระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร

3.1 การผลิตกรดแลกติกระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร

เลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 1 มาทำการผลิตกรดแลกติก โดยใช้การหมักระดับฟลาสก์สภาพการหมักแบบกะโดยใช้ ฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ปริมาตรอาหารร้อยละ 70 เติมหัวเชื้อร้อยละ 5 นำไปบ่มในสภาวะที่ได้จากการทดลองข้อ 2.1 อุณหภูมิที่ได้จากการทดลองข้อ 2.2 วิเคราะห์ผลการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1.วิเคราะห์ผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติเช่นเดียวกับข้อ 1.เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวแปรที่ศึกษาโดยวิธี T – test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

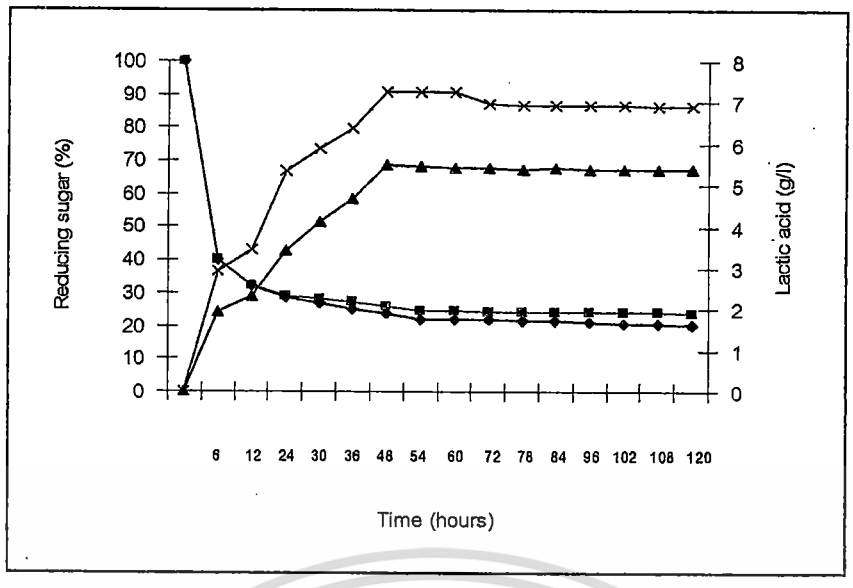

Figure 1. Lactic acid (g/l) and Reducing sugar (%) in 2 liters flask and fermenter by *Lactobacillus casei* ATCC10863 at 37°c

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเวย์โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC10863 พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกประกอบด้วยเวย์เติมสารสกัดยีสต์ร้อยละ 0.5 เปปโตนร้อยละ 1 แคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2 และแหล่งแร่ธาตุ ซึ่งประกอบด้วย ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร แมงกานีสซัลเฟต 0.03 กรัมต่อลิตรและแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.1 กรัมต่อลิตร สภาวะในการหมักที่เหมาะสม คือ สภาวะนิ่งและที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเมื่อเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรกับถังหมักขนาด 2 ลิตร พบว่าการผลิตในถังหมักจะให้ปริมาณกรดแลกติกสูงกว่าการผลิตในฟลาสก์ คือ 7.26 และ 5.49 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

ศิวาพร ศิวเวชช.2546.**วัตถุเจือปนอาหาร เล่ม 1**.นครปฐม : โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ.

สมใจ ศิริโภค.2544.**จุลชีวอุตสาหกรรม**.กรุงเทพฯ : ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.

A.O.A.C. 2000. Official Method of Analysis by the Association of Official Analytical Chemists. **14th ed.** The Association of Official Analytical Chemists, Inc

Arasaratnam,V..Senthuran,A. and Balasubramaniam,K..1996. "Supplementation of whey with glucose and different nitrogen sources for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*." **Enzyme and Microbial Technology (19)** : 482 – 486.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานผลงานวิจัยประจำปีงบประมาณ พ ศ. 2550

เรื่อง

การผลิตL(+) กรดแลกติกโดยใช้ผลิตผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมนม (Whey) สำหรับการหมักแบบกะด้วยเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC 10863

(Production of L(+) Lacticacid Using Dairy by-product (Whey) for Batch Fermentation with *Lactobacillus casei* ATCC 10863)

โดย

รศ. สุขใจ ชูจันทร์

RCH
QD
305
.A2
ส743ก

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....83671
วัน,เดือน,ปี.....11 ก.ย. 2551

b.....11981817
.....
.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

ในการศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเวย์โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC10863พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกประกอบด้วยเวย์เติมสารสกัดยีสต์ร้อยละ 0.5 เปปโตนร้อยละ 1 แคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2 และแหล่งแร่ธาตุ ซึ่งประกอบด้วย ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร แมงกานีสซัลเฟต 0.03 กรัมต่อลิตรและแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.1 กรัมต่อลิตร สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติก คือ สภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและพีเอช 6.5 เมื่อทำการหมักในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร สามารถผลิตกรดแลกติกได้ปริมาณสูงสุด 5.49 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมง 48 โดยมีผลผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.145 กรัมต่อกรัมและอัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.046 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงและเมื่อทำการหมักในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส กวนด้วยใบพัดอัตรา 100 รอบต่อนาที และควบคุมพีเอชที่ 6.5 พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้ปริมาณสูงสุด 7.26 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมง 48 โดยมีผลผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.187 กรัมต่อกรัมและอัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.061 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

ABSTRACT

Lactic acid production from whey by *Lactobacillus casei* ATCC10863was studied. It was found that whey supplemented with 0.5% yeast extract , 1% peptone , 2% $CaCO_3$ and mineral salt which contained 0.25 g/l K_2HPO_4 , 0.03 g/l $MnSO_4$ and 0.1 g/l $MgSO_4$,was the optimal medium for lactic acid production. The optimal condition for lactic acid production was stationary,37°C and pH 6.5.The maximum lactic acid production in 2 liter flasks was 5.49 g/l at 48 hours,Yield $_{(P/S)}$ was 0.145 g/g and the lactic acid productivity was 0.046 g/l.h. Batch fermentation was conducted in 2 liters fermentor at 37°C agitation rate of 100 rpm and pH6.5,maximum lactic acid concentration was 7.26 g/l at 48 hours,Yield $_{(P/S)}$ was 0.187 g/g and the lactic acid productivity was 0.061 g/l.h.

Key Words: lactic acid, whey, *Lactobacillus casei*

S Choojun: kcsukjai@kmitl.ac.th

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

Department of Applied Biology, Faculty of Science. King Mongkut 's Institute of Technology Ladkrabang. Chalongkrung Road, Ladkrabang District Bangkok 10520, Thailand

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

กรดแลกติก นิยมใช้เป็นวัตถุเจือปนในอาหารที่มีความจำเป็นต่อวงการอุตสาหกรรมอาหารมากเพราะกรดแลกติกที่เติมลงไปในอาหารนั้นจะเป็นตัวที่ช่วยเพิ่มกลิ่นและรสของอาหาร ช่วยควบคุมความเป็นกรดด่าง ยืดอายุการเก็บของอาหาร ช่วยป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์และการงอกของสปอร์ ช่วยเสริมประสิทธิภาพของสารป้องกันการหืนและช่วยปรับปรุงลักษณะเนื้อของผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ เป็นต้น (ศิวาพร.2546) นอกจากนี้กรดแลกติกยังนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ ได้แก่ อุตสาหกรรมสิ่งทอ เครื่องหนัง เวชภัณฑ์ เครื่องสำอางและอุตสาหกรรมการทำพลาสติกในรูปของพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable plastics) (Fitzpatrick. 2003) กรดแลกติกสามารถผลิตได้ทั้งกระบวนการทางเคมีและกระบวนการทางชีวภาพ ในการผลิตกรดแลกติกโดยวิธีการทางเคมีเป็นวิธีที่ใช้ค่าใช้จ่ายสูงและมีความยุ่งยากในช่วงการทำให้บริสุทธิ์ เนื่องจากผลผลิตที่ได้จากกระบวนการทางเคมีจะเป็นกรดแลกติกผสม (DL – Lactic) ส่วนการผลิตกรดแลกติกทางชีวภาพเป็นการนำจุลินทรีย์มาหมักกับสับสเตรตซึ่งผลผลิตที่ได้จะอยู่ในรูป D – Lactic หรือ L – Lactic ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ (Kadam *et al*.. 2006)

เวย์เป็นผลิตผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมเนยแข็ง ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อม แต่เวย์สามารถนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ได้เนื่องจากในเวย์ประกอบด้วยน้ำตาลแลคโตส น้ำ โปรตีนที่ละลายได้ วิตามินและแร่ธาตุต่างๆ จึงเหมาะแก่การนำมาเป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดแลกติก (Roukas. 1998) วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือศึกษาองค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกและเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ในระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร และถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยใช้เวย์เป็นสับสเตรต

อุปกรณ์และวิธีการ

1.การศึกษาองค์ประกอบของอาหารสูตรต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรด แลกติก

เตรียมสูตรอาหาร 9 สูตร ปริมาตร 350 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอชที่ 6.5 (± 1) เติมหัวเชื้อร้อยละ 5 ลงในอาหารทั้ง 9 สูตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการหมักที่สภาวะนิ่ง เก็บน้ำหมักทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง วัดค่าพีเอช วิเคราะห์หาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งด้วยวิธีของ A.O.A.C 2000 ปริมาณกรดแลกติกโดยเครื่อง High Performance Liquid Column (HPLC) (สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดแลกติก ประกอบด้วยคอลัมภ์ : Inertsil C8 – 3 ,เฟสเคลื่อนที่ : โพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 3 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์,อัตราการไหล : 1 มิลลิลิตรต่อนาทีและเครื่องตรวจสอบ : เครื่อง UV visible ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร)และปริมาณน้ำตาลแลคโตสตามวิธีของ Dobois.1956 โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS เวอร์ชัน 11 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวแปรที่ศึกษาโดยวิธี Duncans New Multiple Range Test (DMRT)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรอาหารทั้ง 9 สูตรประกอบด้วย

สูตรอาหาร	เวย์	สารสกัดยีสต์	เปปโตน	น้ำตาลแลกโตส	แร่ธาตุ
สูตรที่ 1	-	+	+	+	+
สูตรที่ 2	+	+	-	+	+
สูตรที่ 3	+	-	+	+	+
สูตรที่ 4	+	+	+	-	+
สูตรที่ 5	+	+	+	+	-
สูตรที่ 6	+	-	-	+	+
สูตรที่ 7	+	-	-	-	+
สูตรที่ 8	+	-	-	+	-
สูตรที่ 9	+	-	-	-	-

ที่มา : ดัดแปลงจาก Roukas and Kotzekidou (1998), Fu and Mathew (1999), Fitzpatrick *et al.* (2001) , Nancib *et al.* (2005) และ Idris and Suzana (2006)

หมายเหตุ + หมายถึง เติม - หมายถึง ไม่เติม

องค์ประกอบสูตรอาหารมีดังนี้ สารสกัดยีสต์ร้อยละ 0.5,เปปโตนร้อยละ 1,น้ำตาลแลกโตสร้อยละ 50 และแร่ธาตุประกอบด้วยไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร,แมงกานีสซัลเฟต 0.03 กรัมต่อลิตร, แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.1 กรัมต่อลิตร โดยใช้เวย์ปรับปริมาตร 1 ลิตร

2. การศึกษาสภาวะต่าง ๆที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดแลกติก

2.1 การศึกษาความเร็วรอบที่เหมาะสม

เลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ1 ศึกษาความเร็วรอบที่เหมาะสมโดยผันแปรความเร็วรอบ ที่สภาวะนิ่งและที่ความเร็วรอบ 50, 70, 100, 150 และ 200 รอบต่อนาที ทำการทดลองโดยใช้สภาวะการหมัก วิเคราะห์ผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติเช่นเดียวกับข้อ 1.

2.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

เลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ1 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมโดยผันแปรอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิห้อง 35 37 40 และ 42 องศาเซลเซียสและสภาวะที่ได้จากการทดลองข้อ 2.1 ทำการทดลองโดยใช้สภาวะการหมัก วิเคราะห์ผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติเช่นเดียวกับข้อ 1.

3. ศึกษาการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC10863 โดยการหมักระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรและการหมักระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร

3.1 การผลิตกรดแลกติกระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร

เลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 1 มาทำการผลิตกรดแลกติก โดยใช้การหมักระดับฟลาสก์สภาพการหมักแบบกะโดยใช้ ฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ปริมาตรอาหารร้อยละ 70 เติมหัวเชื้อร้อยละ 5 นำไปบ่มในสภาวะที่ได้จากการทดลองข้อ 2.1 อุณหภูมิที่ได้จากการทดลองข้อ 2.2 วิเคราะห์ผลการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1.วิเคราะห์ผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติเช่นเดียวกับข้อ 1.เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวแปรที่ศึกษาโดยวิธี T – test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าธนบุรี

3.2 การผลิตกรดแลกติกโดยใช้ถังหมักขนาด 2 ลิตร

เลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการทดลองข้อ 1 มาทำการผลิตกรดแลกติก โดยใช้การหมักในถังหมักสภาพการหมักแบบกะโดยใช้ถังหมักขนาด 2 ลิตร ปริมาตรอาหารและหัวเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 3.1 ควบคุมอุณหภูมิที่ได้จากการทดลองข้อ 2.2 กวนด้วยใบพัดในอัตรา 100 รอบต่อนาที (Gao *et al.* 2006) ไม่ต้องพ่นอากาศ วิเคราะห์ผลการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1.วิเคราะห์ผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติเช่นเดียวกับข้อ 1. เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวแปรที่ศึกษาโดยวิธี T – test

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลการศึกษาองค์ประกอบของอาหารสูตรต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดแลกติก

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC10863 ในอาหาร 9 สูตร พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดเท่ากับ 1.82 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมง 48 ในอาหารสูตรที่ 4 สูงกว่าอาหารสูตรที่ 1, 5, 6, 8 และ 9 อย่างมีนัยสำคัญ แต่สูงกว่าอาหารสูตรที่ 2, 3 และ 7 อย่างไม่มีนัยสำคัญ ส่วนการเจริญเติบโตของเชื้อเมื่อดูจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งจะพบว่าในอาหารสูตรที่ 4 จะสูงกว่าอาหารทุกสูตรอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออาหารสูตรที่ 4 มีค่าต่ำกว่าอาหารสูตรที่ 2, 3, 5, 6, 7, 8 และ 9 อย่างมีนัยสำคัญ แต่มีค่าต่ำกว่าอาหารสูตรที่ 1 อย่างไม่มีนัยสำคัญ ส่วนค่าพีเอช พบว่า อาหารสูตรที่ 4 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับอาหารทุกสูตร ดังตารางที่ 1

Table1. Effect of 9 mediums on lactic acid concentration (g/l) ,dry cell mass (g/l),reducing sugar (%) and pH by *Lactobacillus casei* ATCC10863 at 37°c, stationary for 48 h.

Medium	Lactic acid (g/l)	Dry cell mass (g/l)	Reducing sugar (%)	pH
1	1.15 ^{d}	0.43 ^{l}	48.97 ^{de}	4.83 ^{a}
2	1.75 ^{ab}	5.89 ^{b}	68.68 ^{c}	4.64 ^{c}
3	1.72 ^{ab}	5.21 ^{d}	70.16 ^{c}	4.6 ^{d}
4	1.82 ^{a}	6.08 ^{a}	46.25 ^{e}	4.5 ^{e}
5	1.55 ^{c}	2.01 ^{f}	73.21 ^{b}	4.72 ^{b}
6	1.67 ^{b}	4.98 ^{e}	74.26 ^{b}	4.69 ^{b}
7	1.74 ^{ab}	5.38 ^{c}	49.38 ^{d}	4.62 ^{cd}
8	1.46 ^{c}	1.21 ^{h}	77.94 ^{a}	4.69 ^{b}
9	1.53 ^{c}	1.84 ^{g}	50.17 ^{d}	4.7 ^{b}

Value with different letters are significantly different ($p<0.05$)

จากผลการทดลองข้างต้น แสดงให้เห็นว่าอาหารสูตรที่ 2 ซึ่งประกอบด้วยเวย์เติมสารสกัดยีสต์ แลคโตส แร่ธาตุ อาหารสูตรที่ 3 ซึ่งประกอบด้วยเวย์เติมเปปโตน แลคโตส แร่ธาตุ อาหารสูตรที่ 4 ซึ่งประกอบด้วยเวย์เติมสารสกัดยีสต์ เปปโตน แร่ธาตุและอาหารสูตรที่ 7 ซึ่งประกอบด้วยเวย์เติมแหล่งแร่ธาตุเป็นสูตรอาหารที่ให้ปริมาณกรดแลกติกไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญแต่เนื่องจากในอาหารสูตรที่ 4 เชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC10863 นำน้ำตาลไปใช้ในการเจริญและการผลิตกรดแลกติกได้ดีกว่าในอาหารสูตรที่ 2, 3 และ 7 ซึ่งในอาหารสูตรที่ 2 และ 3 มีการเติมน้ำตาลแลคโตสเพิ่มในเวย์ด้วยซึ่งเป็นการสิ้นเปลือง เนื่องจากเชื้อใช้น้ำตาลไม่หมดและมีปริมาณน้ำตาลเหลือมาก ส่วนในอาหารสูตรที่ 7 ถึงแม้จะมีปริมาณน้ำตาลเหลือใกล้เคียงกับอาหารสูตรที่ 4 แต่มีปริมาณเหลือมากกว่าและปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
83671

น้อยกว่าทั้งนี้เนื่องจากในสูตรอาหารที่ 7 ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนจึงทำให้การเจริญของเชื้อเจริญน้อยกว่า โดยการทดลองได้สอดคล้องกับการทดลองของ Kulozik and Wilde (1999) พบว่าเมื่อเติมสารสกัดยีสต์ลงไปในเวย์จะทำให้ชีวมวลของเซลล์และปริมาณกรดเพิ่มขึ้นแต่เมื่อไม่เติมสารสกัดยีสต์การเจริญของเซลล์และปริมาณกรดจะลดลง

2. ผลการศึกษาสภาวะต่าง ๆที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดแลกติก

2.1 ผลการศึกษาความเร็วรอบที่เหมาะสม

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC10863 ในอาหารที่ได้จากการทดลองข้อ1.สภาวะนิ่ง ความเร็ว 50,70, 100,150 และ 200 รอบต่อนาที พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดเท่ากับ 1.77 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมง 48 ที่สภาวะนิ่ง สูงกว่าความเร็ว 50, 70, 100, 150 และ 200 รอบต่อนาที อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนการเจริญเติบโตของเชื้อ เมื่อดูจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งจะพบว่า ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที จะสูงกว่าที่สภาวะนิ่ง ความเร็ว 50, 70, 100 และ 150 รอบต่อนาที อย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนร้อยละ 10 ในการสร้างเซลล์ ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 50 – 55 ในการสร้างเซลล์ (สมใจ. 2544) ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือที่สภาวะนิ่งมีค่าต่ำกว่าที่ความเร็ว 100, 150 และ 200 รอบต่อนาที อย่างมีนัยสำคัญ แต่มีค่าต่ำกว่าความเร็ว 50 และ 70 รอบต่อนาที อย่างไม่มีนัยสำคัญ ส่วนค่าพีเอช พบว่าที่สภาวะนิ่งมีค่าต่ำกว่าที่ความเร็วรอบทุกค่า ดังตารางที่ 2

Table2. Effect of rotation on lactic acid concentration (g/l),dry cell mass (g/l),reducing sugar (%) and pH by *Lactobacillus casei* ATCC10863 at 37°c, 48 h.

Rotation (rpm)	Lactic acid (g/l)	Dry cell mass (g/l)	Reducing sugar (%)	pH
stationary	1.77 [a]	1.24 [f]	46.83 [d]	4.55 [c]
50	1.62 [b]	2.15 [e]	47.28 [d]	4.60 [b]
70	1.55 [bc]	2.79 [d]	48.59 [d]	4.62 [b]
100	1.49 [cd]	2.94 [c]	52.41 [c]	4.63 [ab]
150	1.43 [d]	3.24 [b]	56.35 [b]	4.63 [ab]
200	1.16 [e]	3.48 [a]	62.48 [a]	4.66 [a]

Value with different letters are significantly different ($p<0.05$)

จากผลการทดลองข้างต้น แสดงให้เห็นว่า *Lactobacillus casei* ATCC10863 สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงที่สภาวะนิ่งและสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่มีการเขย่าที่ความเร็วรอบต่างๆ การทดลองได้สอดคล้องกับการทดลองของ Arasaratnam *et al.* (1996) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเวย์โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ในสภาวะนิ่งพบว่ากรดแลกติกที่ผลิตได้มีปริมาณสูงถึง 41 กรัมต่อลิตร

2.2 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดเท่ากับ 1.76 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมง 48 ที่ 37 องศาเซลเซียส สูงกว่าอุณหภูมิห้อง 35, 40 และ 42 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนการเจริญเติบโตของเชื้อเมื่อดูจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งจะพบว่า อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะสูงกว่าอุณหภูมิห้อง 35, 40 และ 42 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีค่าต่ำกว่าอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างไม่มีนัยสำคัญ แต่ต่ำกว่าอุณหภูมิห้อง 40 องศาเซลเซียส และ 42 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนค่าพีเอช พบว่า ที่อุณหภูมิ 40 และ 42 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญแต่แตกต่างกันที่อุณหภูมิห้อง 35 และ 37 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญ ดังตารางที่ 3

Table3. Effect of temperature on lactic acid (g/l),dry cell mass (g/l),reducing sugar (%) and pH by *Lactobacillus casei* ATCC10863 at stationary, 48 h.

Temperature (^{o}c)	Lactic acid (g/l)	Dry cell mass (g/l)	Reducing sugar (%)	pH
temperature room	1.63 ^{b}	1.04 ^{c}	54.35 ^{b}	4.61 ^{ab}
35	1.64 ^{b}	1.08 ^{c}	51.67 ^{c}	4.59 ^{bc}
37	1.76 ^{a}	1.97 ^{a}	49.58 ^{c}	4.54 ^{d}
40	1.40 ^{c}	0.92 ^{d}	66 ^{a}	4.64 ^{a}
42	1.36 ^{c}	0.86 ^{d}	67.58 ^{a}	4.64 ^{a}

Value with different letters are significantly different ($p<0.05$)

จากผลการทดลองข้างต้น แสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงกว่าที่อุณหภูมิห้อง 35, 40 และ 42 องศาเซลเซียส โดยการทดลองได้สอดคล้องกับการทดลองของ Mostafa (1996) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเวย์ โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* พบว่าเชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3. ผลการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC10863 โดยการหมักระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรและการหมักระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร

พบว่า ปริมาณกรดแลกติกใน ถังหมักให้ปริมาณสูงกว่าในฟลาสก์ ดังตารางที่ 4 และรูปที่ 1 จากผลการทดลองข้างต้นแสดงว่า การผลิตกรดแลกติกในถังหมักมีการควบคุมสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Gao *et al.* (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* NBRC 3863 ซึ่งใช้ถังหมักขนาด 2 ลิตร มีการกวนโดยใช้ความเร็ว 100 รอบต่อนาที พบว่าปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้มีปริมาณสูงถึง 87 กรัมต่อลิตร ดังนั้นการผลิตกรดแลกติกโดยใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC10863 เมื่อทำการหมักในถังหมักจึงดีกว่าการหมักในฟลาสก์ เพราะได้ปริมาณกรดแลกติกสูงกว่าเนื่องจากการผลิตกรดในถังหมักสามารถควบคุมพีเอช อุณหภูมิ และมีการกวน จึงทำให้มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก

Table 4. p-value of lactic acid production in 2 liters flask and fermenter at 48 h. By T-test method

	Lactic acid (g/l)	Yield$_{(p/s)}$ (g/g)	Productivity (g/l.h)	Reducing sugar (%)
flasks	5.49	0.145	0.114	12.95
fermenter	7.26	0.187	0.151	11.79
p-value	0.000	0.000	0.000	0.000

p-value < 0.01 = Value with different letters are significantly different ($p<0.01$)

0.01 < p-value<0.05 = Value with different letters are significantly different ($p<0.05$)

p – value > 0.05 = no signal

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

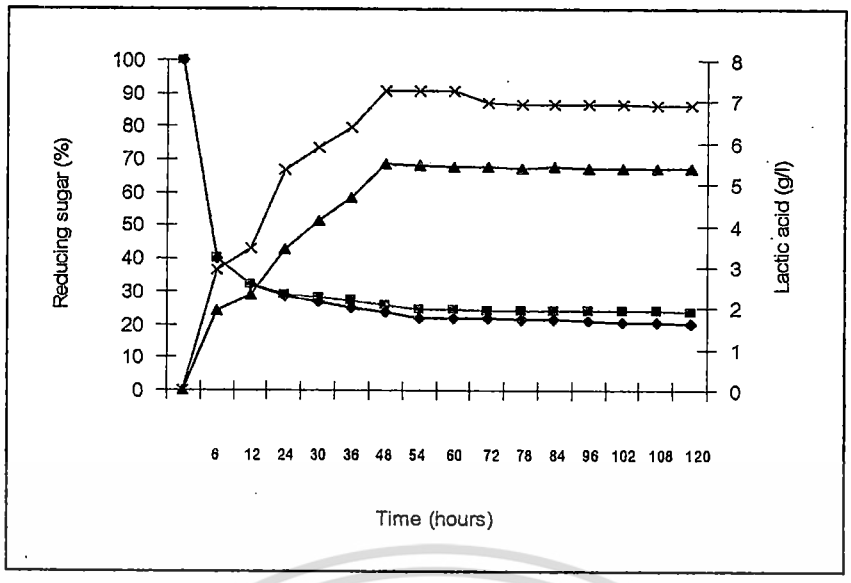

Figure 1. Lactic acid (g/l) and Reducing sugar (%) in 2 liters flask and fermenter by *Lactobacillus casei* ATCC10863 at 37°c

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเวย์โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC10863 พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกประกอบด้วยเวย์เติมสารสกัดยีสต์ร้อยละ 0.5 เปปโตนร้อยละ 1 แคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2 และแหล่งแร่ธาตุ ซึ่งประกอบด้วย ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร แมงกานีสซัลเฟต 0.03 กรัมต่อลิตรและแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.1 กรัมต่อลิตร สภาวะในการหมักที่เหมาะสม คือ สภาวะนิ่งและที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเมื่อเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรกับถังหมักขนาด 2 ลิตร พบว่าการผลิตในถังหมักจะให้ปริมาณกรดแลกติกสูงกว่าการผลิตในฟลาสก์ คือ 7.26 และ 5.49 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

ศิวาพร ศิวเวชช.2546.**วัตถุเจือปนอาหาร เล่ม 1**.นครปฐม : โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ.

สมใจ ศิริโภค.2544.**จุลชีวอุตสาหกรรม**.กรุงเทพฯ : ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.

A.O.A.C. 2000. Official Method of Analysis by the Association of Official Analytical Chemists. 14th ed. The Association of Official Analytical Chemists, Inc

Arasaratnam,V..Senthuran,A. and Balasubramaniam,K..1996. "Supplementation of whey with glucose and different nitrogen sources for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*." **Enzyme and Microbial Technology (19)** : 482 – 486.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dubois, M., Gijjes, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith F. 1956. "Colorimetric method for determination of sugars and related substrate." Analitical Chemistry. 28 : 350-356.

Fitzpatrick,J.J. and O'Keeffe,U..2001. "Influence of whey proteinhydrolysate addition to whey permeate batch fermentations for producing lactic acid." **Process Biochemistry (37)** : 183 – 186.

Fitzpatrick,J.J..Murphy,C.Mota,F.M..Pauli,T..2003. " Impurity and cost considerations for nutrient supplementation of whey permeate fermentations to produce lactic acid for biodegradable plastics." **International Dairy Journal (13)** : 575 – 580.

Fu,W. and Mathews,A.P..1999. "Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*:kinetic model and effects of pH,substrate, and oxygen." **Biochemical Engineering Journal (3)**:163 – 170.

Gao,M.T..Hirata,M..Toorisaka,E. And Hano,T..2006. "Acid – hydrolysis of fish wastes for lactic acid fermentation." **Bioresource Technology (97)**:2414 – 2420.

Idris,A. and Suzana,W..2006 "Effect of sodium alginate concentration, bead diameter , initial pH and temperature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *L .delbrueckii*." **Process Biochemistry (41)**.1117 – 1123.

Kadam, S.R..Patil,SS..Bastawde,KB..Khire,J.M.. and Gokhale,D.V..2006.. "Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 for lactic acid production." **Process Biochemistry (41)** :72 – 126.

Kulozik,U.andWilde,J.. 1999. "Rapid lactic acid production high cell concentrations in whey ultrafiltration by *Lactobacillus helveticus*." **Enzyme and Microbial Technology (24)** :297 – 302.

Mostafa,N.A..1996. " Production of lactic acid from whey with agar immobilized cells in a continuous packed tubular reactor." **Energy Convers.Mgmt Vol.37 No3.** : 253 – 260.

Nancib,A.Nancib,N.Meziane _ Cherif,D. Boubendir,A.Fick,M. Boudrant,J.O,Seph..2005. " Joint effect of on lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp.*rhamnosus*." **Bioresource Technology (96)** : 63 – 67.

Roukas, T. and kotzekidou, P. 1998. " Lactic acid production from deproteinized whey by mixed cultures of free and coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells using fedbatch culture." Enzyme and Microbial Technology. 22 : 199 – 204.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้